



⑫ **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

⑲ Numéro de dépôt : **91430009.0**

⑤① Int. Cl.⁵ : **C07C 229/36, C07D 209/16,
G01N 33/78**

⑳ Date de dépôt : **13.05.91**

③① Priorité : **15.05.90 FR 9006292
30.01.91 FR 9101292**

 ④③ Date de publication de la demande :
21.11.91 Bulletin 91/47

 ⑥④ Etats contractants désignés :
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

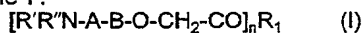
 ⑦① Demandeur : **IMMUNOTECH S.A.
70, route Léon Lachamp Case 915- Luminy
F-13288 Marseille Cédex 9 (FR)**

⑦② Inventeur : **Chauveau, Jacques
693 avenue de Mazargues
F-13008 Marseille (FR)**
 Inventeur : **Delaage, Michel
16 rue Adolphe-Thiers
F-13001 Marseille (FR)**
 Inventeur : **Morel, Anne
57 C traverse Marie-Louise
F-13008 Marseille (FR)**
 Inventeur : **Segu, Louis
576 chemin de Riquet
F-13400 Marseille (FR)**

 ⑦④ Mandataire : **Rinuy, Santarelli
14, avenue de la Grande Armée
F-75017 Paris (FR)**

⑤④ **Nouveaux dérivés de médiateurs endogènes, leurs sels, procédé de préparation, applications, et compositions les renfermant**

⑤⑦ Dérivés de molécules biologiquement actives comportant une fonction amine primaire et un noyau hydroxylé ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale I :



dans laquelle

n représente un nombre entier de 1 à 10 ;

A représente une chaîne alcoylène linéaire ou ramifiée renfermant de 1 à 5 atomes de carbone ;

B représente un noyau aromatique comportant de 6 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitués et éventuellement un hétéroatome, ou un groupement -B₁-X-B₂-, dans lequel B₁ et B₂ ont la signification de B ci-dessus et X représente un atome d'oxygène ou une chaîne alcoylène renfermant de 1 à 4 atomes de carbone,

-R₁ représente un reste aminé ou un reste d'un alcool, et

R' et R'' représentent un radical alcoyle renfermant de 1 à 5 atomes de carbone, un atome d'hydrogène ou un radical hydrophobe, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques, étant entendu que R' et R'' ne peuvent pas représenter un radical dérivé du 2-hydroxy-3-phénoxypropyle ou du 2-hydroxy-2-phényléthyle.

ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques ; procédé de préparation et applications notamment à l'imagerie, à la purification, à la préparation d'anticorps, au dosage de l'hormone totale et à titre

de médicaments, compositions les renfermant et kits d'analyse.

La présente invention concerne de nouveaux dérivés de médiateurs endogènes, leurs sels, leur procédé de préparation et leurs applications notamment à l'analyse des médiateurs endogènes, l'analyse ou la purification des récepteurs desdits médiateurs, la visualisation de leurs sites récepteurs, la préparation d'anticorps et l'utilisation desdits anticorps pour l'analyse des médiateurs endogènes, leur application à titre de médicaments et compositions les renfermant.

Les messages entre les cellules sont transmis grâce à des vecteurs chimiques (hormone ou neuromédiateur) dont la spécificité est assurée par la protéine cible : le récepteur. Les molécules porteuses de l'information peuvent être des peptides ou des molécules de faible poids moléculaire. Parmi celles-ci, un certain nombre présentent simultanément une ou plusieurs fonctions hydroxyle et une ou plusieurs fonctions amine, par exemple les indolamines, les catécholamines (neuromédiateurs) et la thyroxine (hormone).

Ces molécules jouent un rôle primordial dans la physiologie : les indolamines et les catécholamines dans la transmission et l'intégration de l'information dans le système nerveux central et la thyroxine dans la régulation du métabolisme basal. Il est essentiel d'en assurer le dosage de façon à affiner les diagnostics ou à aider les recherches fonctionnelles. Dans le cas des neuromédiateurs, les sites de liaison des récepteurs assurent la spécificité de la réponse de la cellule effectrice : la modification chimique ponctuelle des ligands endogènes permet de différencier les divers types et sous-types de récepteurs membranaires.

Les ligands modifiés peuvent être des drogues agissant spécifiquement sur les fonctions physiologiques contrôlées par ces récepteurs.

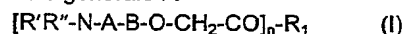
Certaines hormones sont présentes au niveau sérique sous forme liée à des protéines porteuses. Ces protéines assurent le transport de ces hormones du lieu de synthèse aux cellules-cibles. Les hormones thyroïdiennes sont présentes sous forme non liée à des taux inférieurs à 1 % de la quantité totale d'hormones (libre + liée). La modification chimique ponctuelle des hormones thyroïdiennes permet d'améliorer leur dosage.

Les Demandeurs ont découvert que l'on peut atteindre ces objectifs grâce à une O-carboxyméthylation sur le groupement hydroxyphényle des molécules endogènes portant également une amine primaire.

La carboxyméthylation (Gurd, *Methods in Enzymology*, vol. XI, 1967, p. 532-541) a souvent été utilisée pour bloquer les fonctions amines des aminoacides. La carboxyméthylation des groupements hydroxyphényle est décrite comme une réaction parasite (Korman et Clarke, *J. Biol. Chem.* 221, 1956, p. 113-131). Celle des groupements hydroxyphényle

(Spector, 1982) a été utilisée pour coupler la morphine (ne possédant pas de fonction amine) à une protéine en vue de l'obtention d'anticorps.

C'est pourquoi la présente demande a pour objet de nouveaux dérivés de molécules biologiquement actives comportant une fonction amine primaire et un noyau hydroxylé, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale I :



dans laquelle

A représente une chaîne alcoylène linéaire ou ramifiée renfermant de 1 à 5 et de préférence 2 atomes de carbone, la ramification pouvant comporter un groupement sulfhydryle;

B représente un noyau aromatique comportant de 6 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitués et éventuellement un hétéroatome, ou un groupement $-B_1-X-B_2-$, dans lequel B_1 et B_2 ont la signification de B ci-dessus et X représente un atome d'oxygène ou une chaîne alcoylène renfermant de 1 à 4 atomes de carbone,

$-R_1$ représente un reste aminé ou un reste d'alcool, et

$-R'$ et R'' représentent un radical alcoyle renfermant de 1 à 5 atomes de carbone, un atome d'hydrogène un radical acyle aliphatique renfermant de 2 à 5 atomes de carbone, amino-acyle ou un radical hydrophobe, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques, étant entendu que R' et R'' ne peuvent pas représenter un radical dérivé du 2-hydroxy-3-phénoxypropyle ou du 2-hydroxy-2-phényléthyle.

Les sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques peuvent être par exemple des sels formés avec les acides chlorhydrique, bromhydrique, nitrique, sulfurique, phosphorique, acétique, formique, propionique, benzoïque, maléique, fumarique, succinique, tartrique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique, alcane sulfoniques tels que les acides méthane ou éthane sulfoniques, arylsulfoniques, tels que les acides benzène ou paratoluène sulfoniques ou carboxyliques. On retient plus particulièrement les sels d'anions chaotropiques, propres à faciliter la dissolution en milieu aqueux, tels que les ions citrates ou succinates.

La chaîne alcoylène représentée par A peut être une chaîne propylène, isopropylène, méthylène, et de préférence éthylène; elle peut être substituée par un groupement sulfhydryle.

Le noyau aromatique peut comporter un seul cycle tel qu'un noyau phényle ou deux cycles, comme par exemple un noyau indole. Un ou plusieurs des atomes de carbone de B peuvent être substitués par un radical choisi parmi les atomes d'halogène tel que chlore, ou des radicaux alcoxy tels qu'éthoxy ou de préférence méthoxy, alkyle tels que propyle, éthyle, de préférence méthyle, alkylthio tel que méthylthio, polyhalogénoalkyle tel que trifluorométhyle.

L'hydroxyle substitué par le radical $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$ selon la présente invention peut se trouver en toutes positions mais se trouve notamment sur un cycle phényle du noyau et de préférence dans les positions que ce radical hydroxyle occupe habituellement dans les médiateurs naturels.

Lorsque R' et R'' représentent un radical alcoyle, il s'agit de préférence d'un radical méthyle ou éthyle. R' et R'' représentent avantageusement l'hydrogène. Par radical amino-acyle l'on entend des restes d'amino acides, peptides ou protéines. Par radical hydrophobe l'on entend que ledit radical possède des chaînes saturées et ne comporte pas de groupements tels que amino ou hydroxy libres.

R' et R'' représentent avantageusement un atome d'hydrogène, un radical méthyle, éthyle, le radical $\text{NR}'\text{R}''$ pouvant éventuellement être quaternisé et on peut citer par exemple les radicaux triméthyl ammonium ou diéthylméthyl ammonium.

R' et R'' représentent également notamment un radical tyrosyl ou lysyl.

Dans le groupement $-\text{B}_1-\text{X}-\text{B}_2-$, B_1 et B_2 représentent de préférence un noyau phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux tels que des atomes d'halogène, notamment d'iode ou les autres radicaux ci-dessus décrits pour le noyau B.

Lorsque X représente une chaîne alcoylène, celle-ci comprend de préférence deux ou plutôt un seul atome de carbone.

Dans le cas où R_1 représente un reste aminé, symbolisé par $-\text{NH}-\text{R}$, le reste R qui est donc fixé au carboxyle par une liaison amide peut être de toute nature mais est de préférence un reste apte au marquage, par exemple à l'aide d'un ou plusieurs atomes radioactifs, tel que l' ^{125}I .

La nature chimique de ce reste comprendra de préférence un acide aminé qui servira à la liaison avec le reste de la molécule de formule (I). Ce reste aminé sera par exemple une protéine ou un polypeptide renfermant de 2 à 10 acides aminés et de préférence 2 ou 3 acides aminés, ou encore un acide monoaminé, tel la tyrosine, ou diaminé.

Lesdits acides aminés seront de préférence les acides aminés naturels ou leurs dérivés amidés ; c'est ainsi par exemple que si le radical R_1 est un dipeptide constitué d'un reste glycyle et d'un reste tyrosyle, on pourra par exemple remplacer le reste tyrosyle par un reste tyrosynamide.

La diamine pourra servir au couplage de fluorophores ou à la synthèse de dimères de formule (I') :

$$\text{R}'\text{R}'' \text{ N-A-B-O-CH}_2\text{-CO-NH-R-NH-CO-CH}_2\text{-O-B-A-N-R}'\text{R}'' \quad (\text{I}')$$

dans laquelle R, R' , R'' , A et B ont la signification déjà indiquée.

Parmi les restes aminés, on peut citer notamment les restes amino, hydrazino, nitrilo ($-\text{N}_3$), les peptides ou dérivés de peptides suivants : tyrosyl cystéine, tyrosyl-cystéinamide, tyrosyl glycine, tyrosyl glycina-

mide.

On peut citer également les dérivés protéiques reliés au carboxyle directement ou par l'intermédiaire d'un peptide ou d'un aminoacide et d'un agent hétérobifonctionnel susceptible de réagir avec un groupe sulfhydryle et un groupe amino, tel le SMCC, et on peut citer par exemple les restes tyrosyl-cystéinyl-protéine, tyrosyl-cystéinyl-agent hétérobifonctionnel tel (le SMCC)-protéine, glycyl tyrosine, ou le reste glycyl-1,4-butanediamine.

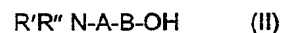
Parmi les restes dérivés d'un alcool, on peut citer notamment ceux dérivés de phénols, éventuellement substitués sur le phényle, tel le 2 ou 4-nitrophénol, ceux dérivés du phényle méthanol, éventuellement substitués sur le phényle par un radical alkyle, ceux dérivés d'hydroxyalkyl triméthylsilyle notamment l'hydroxy éthyl, ceux dérivés des alcools aliphatiques en C_1-C_{16} .

Des dérivés préférés selon l'invention sont des dérivés de formule (I) tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce que B représente un noyau phényle, un groupement p-phénoxyphényle, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, notamment un groupement 4-(3,5-diiodophénoxy)-3,5-diiodophényle, ou un noyau indole, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques. Les noyaux peuvent être substitués par un atome d'halogène, de préférence le chlore, le brome ou l'iode, notamment le noyau indole, et dans ce cas, de préférence en position 2.

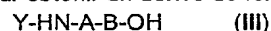
Parmi ces derniers, pour lesquels B représente un noyau indole, on retient notamment ceux caractérisés en ce que R_1 représente une diamine, une protéine, un acide aminé ou un polypeptide constitué au plus de 5 acides aminés ou des dérivés desdits acides aminés ou polypeptides, et notamment le tryptamine 5-O-carboxyméthylglycyltyrosinamide [S-CM-GT-NH_2], de même que les dérivés cités dans les exemples, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques.

Parmi ceux-ci, on retient également ceux caractérisés en ce que A représente un radical $-(\text{CH}_2)_2-$ et R' et R'' représentent un radical alkyle linéaire ou ramifié renfermant de 1 à 5 atomes de carbone.

La présente demande a aussi pour objet un procédé de préparation des dérivés ci-dessus décrits, caractérisé en ce que l'on fait réagir un dérivé de formule (II) :

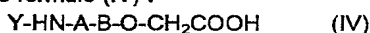


dans laquelle R' , R'' , A et B ont la signification déjà indiquée, avec un dérivé comportant un groupement protecteur des fonctions amine dans le cas où $\text{R}'=\text{R}''=\text{H}$, pour obtenir un dérivé de formule (III) :

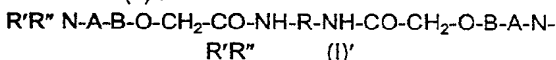


dans laquelle A et B ont la signification déjà indiquée et Y représente un groupement protecteur des fonctions amine, facilement clivable, que l'on fait réagir avec un acide halogéno-acétique pour obtenir un

dérivé de formule (IV) :



dans laquelle A, B et Y ont la signification déjà indiquée, que l'on fait réagir avec un dérivé aminé ou un alcool pour obtenir le dérivé de formule (I) telle que définie ci-dessus le cas échéant sous forme dimère de formule (I') :



dans le cas d'une diamine, ou polymère dans le cas d'une polyamine que l'on isole et, si désiré, salifie.

Les dérivés de formule générale I présentent un caractère basique. On peut avantageusement préparer le cas échéant des sels des dérivés de formule générale I, en faisant réagir en proportions sensiblement stoechiométriques un acide minéral ou organique avec ledit dérivé de formule générale I. Les sels peuvent éventuellement être préparés sans isoler les bases correspondantes.

Le dérivé apte à greffer un groupement protecteur des fonctions amine sur le dérivé de formule (II) peut être par exemple un chlorure d'acide [9-fluorophenyl-méthyl oxycarbonyl (FmocCl), benzyloxycarbonyl (BzCl)] et de préférence un anhydride [le di-t-butylidicarboxonate, (BOC)₂O, ou l'anhydride citraconique].

La préparation du dérivé de formule (IV) est réalisée de préférence à pH alcalin en présence d'un oxyde métallique tel que l'oxyde de magnésium et d'un acide halogéno-acétique, ce dernier pouvant être un chlorure mais étant de préférence un bromure.

La réaction du dérivé de formule (IV) avec le dérivé aminé (R₁) est réalisée de préférence après activation du groupement carboxylique sous forme d'anhydride mixte par un alkylchlorocarbonate tel que l'éthylchloroformate. On peut utiliser également comme activateurs les chlorures d'acide, les carbodiimides ou la formation préalable d'un ester hydrolysable de N-hydroxysuccinimide.

Le clivage du groupement protecteur de l'amine est réalisé si nécessaire par hydrolyse acide, notamment à l'aide d'un acide tel que l'acide trifluoroacétique, ou alcaline, notamment à l'aide de la pipéridine.

Les médiateurs de formule (II) et leurs analogues de synthèse sont bien connus par diverses publications et brevets.

Le couplage du dérivé de formule (I), ou de l'un de ses sels, à un marqueur peut être réalisé grâce à la présence d'une fonction carboxyle libre dans le résidu R₁ de la formule I, tel que décrit pour la liaison du reste aminé au reste de la molécule de formule I.

Si le marqueur est l'iode, le reste aminé comportera une tyrosine (ou une tyrosinamide) ou une histamine.

Si le marqueur est une enzyme, le reste aminé comportera des groupements carboxyle ou sulfhydryle.

Si le marqueur est un élément fluorescent, le reste aminé comportera une diamine.

On retient encore les dérivés de formule I ci-dessus décrits, caractérisés en ce qu'ils comportent une protéine greffée sur le chaînon O-carboxyméthyle selon les procédés ci-dessus.

Les dérivés objet de la présente invention possèdent de très intéressantes propriétés pharmacologiques. Ils sont doués notamment d'une remarquable affinité pour les récepteurs de la sérotonine particulièrement 5HT_{1D}.

Ces propriétés sont illustrées plus loin dans la partie expérimentale. Elles justifient l'utilisation des dérivés de médiateurs ci-dessus décrits ainsi que de leurs sels d'addition avec les acides pharmaceutiquement acceptables à titre de médicament.

Les médicaments selon la présente invention trouvent leur emploi par exemple dans le traitement tant curatif que préventif des maladies liées à un dysfonctionnement des récepteurs 5HT et particulièrement des différents récepteurs 5HT_{1D}, à leur dérégulation ou à des modifications du ligand endogène (généralement la sérotonine). Ils trouvent en particulier leur emploi dans le traitement de la migraine.

La dose usuelle, variable selon le sujet traité et l'affection en cause, peut être, par exemple, de 0,1 à 10 mg par jour par voie orale chez l'homme du dérivé de l'exemple 1.

L'invention a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques qui renferment au moins un dérivé précité ou un de ses sels d'addition avec les acides pharmaceutiquement acceptables, à titre de principe actif.

A titre de médicaments les dérivés répondant à la formule générale I ainsi que leurs sels d'addition avec les acides pharmaceutiquement acceptables peuvent être incorporés dans des compositions pharmaceutiques destinées à la voie digestive ou parentérale.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être, par exemple, solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme par exemple les comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les caramels, les suppositoires, les préparations pour instillations nasales, les préparations injectables ; elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

Les dérivés de formule (I) possèdent, comme on l'a vu, une importante affinité pour les récepteurs ou également la protéine de transport de la molécule endogène correspondante.

Les dérivés objet de la présente demande éventuellement marqués par exemple à l'aide d'un élément radioactif, notamment l' ^{125}I , ou fluorescent ou encore à l'aide d'une enzyme sont utiles notamment pour l'imagerie tant *in vitro* que pour certains *in vivo* des sites de liaison des médiateurs endogènes. Ces propriétés sont illustrées ci-après dans la partie expérimentale. On peut aussi utiliser comme marqueur une protéine portant un or colloïdal ou un produit de contraste.

La présente demande a donc également pour objet les dérivés ci-dessus décrits, caractérisés en ce qu'ils sont sous une forme marquée.

La présente demande a aussi pour objet l'application des dérivés ci-dessus décrits à la purification des récepteurs des médiateurs endogènes.

La O-carboxyméthylation des hormones thyroïdiennes module l'interaction de ces hormones avec leurs protéines porteuses. Cette propriété peut être utilisée pour éliminer la liaison de ces hormones thyroïdiennes natives à ces protéines porteuses. Dans le cadre d'une activité immunoanalytique, la création d'analogues non reconnus par l'anticorps, inhibiteurs de la liaison aux protéines de transport, permet le dosage de l'hormone totale.

La présente demande a encore pour objet l'application des dérivés ci-dessus décrits et en particulier les dérivés de la thyroxine O-carboxyméthyle à l'inhibition de la liaison aux protéines de transport, pour le dosage de l'hormone totale.

Les dérivés de la présente demande, pour lesquels R_1 est une protéine, permettent la préparation d'anticorps dirigés contre le médiateur correspondant au reste de la molécule de formule (I).

La présente demande a également pour objet l'application des dérivés ci-dessus décrits à l'imagerie des sites de liaison des médiateurs endogènes.

La présente demande a tout autant pour objet l'application des dérivés de formule (I) à la préparation d'anticorps dirigés contre les médiateurs endogènes.

Le dosage des médiateurs endogènes [de formule (II), $R'R''\text{-N-A-B-OH}$] ou de leurs dérivés pourra être assuré grâce à ces anticorps, en utilisant les dérivés de formule (I) comme traceur.

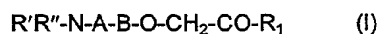
La présente demande a enfin pour objet les kits d'analyse, caractérisés en ce qu'ils renferment l'un au moins des dérivés de formule (I) ci-dessus décrits.

Les exemples qui suivent illustrent la présente invention sans toutefois la limiter.

PARTIE EXPERIMENTALE

EXEMPLE 1. Synthèse de dérivés de la thyroxine

Série d'exemples répondant à la formule générale I :



Dans laquelle $R' = R'' = \text{H}$ $\text{A} = -\text{CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2$

B est du type $\text{-B}_1\text{-X-B}_2\text{-}$ avec $\text{X} = \text{Oxygène}$ si $\text{B}_1 = \text{B}_2 = \text{C}_6\text{H}_2\text{I}_2$; dérivés de la 3,3',5,5'-tétraiodo-L-thyronine ou L-thyroxine (T4)

si $\text{B}_1 = \text{C}_6\text{H}_2\text{I}_2$ et $\text{B}_3 = \text{C}_6\text{H}_3\text{I}$ dérivés de la 3,3', 5-triiodo-L-thyronine (T3)

Stade A

1. Synthèse du N-tertiobutyl carbamate-O-carboxyméthyl T4 ($\text{BOC-T}_4\text{-O-CH}_2\text{-COOH}$) ou $\text{T}_3(\text{BOC-T}_3\text{-O-CH}_2\text{-COOH})$

1.1. Protection du groupe amine

Pour les synthèses de l'exemple 1, on utilise la T_4 ou de T_3 sous forme d'acide libre ou modifié par exemple par amidation.

La protection du groupe amine de la T_4 et de la T_3 est réalisée avec le di-t-butyl dicarbonate $[(\text{BOC})_2\text{O}]$ (Tarbell et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1972, 730-732). A 10 μmoles de T_4 ou de T_3 sont ajoutés 30 μl de triéthylamine (TEA, 7,2 N) et 240 μl de $(\text{BOC})_2\text{O}$ 50 mM dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO).

1.2 Carboxyméthylation du groupement hydroxyphényle

La solution obtenue précédemment est mélangée volume à volume avec une solution aqueuse d'acide bromoacétique 500 mM, le pH ajusté à 12, en présence d'oxyde de magnésium et d'azote gazeux. L'agitation est maintenue pendant 24 h à l'obscurité. Le milieu est centrifugé 10 minutes à 10 000 tours/minute.

1.3 Purification des produits par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Le surnageant est dilué dans 5 volumes d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,05 %. Un ml de ce mélange est injecté dans une colonne de silice greffée μ Bondapak C_{18} (10 μm , diamètre 3,9 mm, longueur 30 cm). Les dérivés de la T_3 sont élués en isocratique pendant 30 mn avec un mélange TFA 0,05 % 50 vol. - méthanol 50 vol. ; puis avec un gradient atteignant 100 % de méthanol en 60 minutes. Pour les dérivés de la T_4 , le mélange initial d'élution isocratique est composé de TFA 0,05 % 40 vol. - méthanol 60 vol. Le débit est de 1 ml/mn.

Les produits initiaux (T_3 , T_4) sont recueillis au cours de la période isocratique. Les dérivés substitués sont recueillis dans le gradient :

BOC-T_3 : 75 % méthanol

$\text{BOC-T}_3\text{-O-CH}_2\text{-COOH}$: 78 % méthanol

BOC-T_4 : 80 % méthanol

$\text{BOC-T}_4\text{-O-CH}_2\text{-COOH}$: 82 % méthanol

(Figure 1)

Les fractions recueillies sont analysées en spectrophotométrie UV. Les spectres d'absorption en milieu basique et acide sont comparés de façon à déterminer si la substitution a bien eu lieu sur le grou-

pement hydroxyle (Korman Clarke, op. cité). Les dérivés O-carboxyméthylés ne présentent pas de déplacement de spectre en milieu basique (Figure 1). Les fractions contenant le dérivé BOC-T₃-O-CH₂-COOH et BOC-T₄-O-CH₂-COOH sont évaporées et lyophilisées.

2. Conjugaison des dérivés O-carboxyméthylés avec le radical R-NH₂

2.1 Allongement de la chaîne latérale nouvellement créée :

On peut créer une liaison amide entre le groupement carboxyméthyle et un amino-acide, une chaîne peptidique ou une protéine native ou modifiée.

Le groupement carboxyle du BOC-T₃-O-CH₂-COOH ou BOC-T₄-O-CH₂-COOH est activé par l'éthylchloroformate (ECF, 7 µl additionné de 7 µl de TEA dans 5 ml de diméthylformamide). Un volume de cette solution tel que l'ECF soit équimolaire avec le produit à activer est versé sur le lyophilisat. Après 5 mn d'activation à 4°C, on ajoute un volume égal de solution aqueuse de NH₂-R à une concentration 50 fois supérieure à celle du dérivé carboxyméthylé. NH₂-R peut être l'histamine ou Gly-Tyr, Tyr-Gly, Cys, Gly-Cys, sous forme d'acide libre ou d'amide.

Les produits sont séparés par CLHP sur colonne µ Bondapack C18 en gradient TFA 0,05 % - Méthanol.

2.2 Préparation de dérivés macromoléculaires

2.2.1. Greffe des dérivés BOC-T₃-O-CH₂-CO-NH-R sur des protéines.

Les dérivés obtenus en 1.3. ou 2.1. ci-dessus ou sous forme acide libre, sont activés par l'éthylchloroformate (voir 2.1.) et greffés sur une protéine native (BSA, sérum albumine de boeuf) ou modifiée (Gly-BSA).

On sépare par dialyse les dérivés BOC-T₃-O-CH₂-CO-NHR des dérivés couplés à la BSA, du type BOC-T₃-O-CH₂-CO-NH-R-BSA avec

R = His, Gly-Tyr, Tyr-Gly, Cys, Gly-Cys

Le groupement amine de ces dérivés peut être déprotégé selon 3.

2.2.2. Greffe des dérivés T₃-O-CH₂-CONH-Cys ou T₃-O-CH₂-CONH-Gly-Cys sur des protéines.

Des protéines sont modifiées par adjonction d'un agent de réticulation hétérobifonctionnel du type N-hydroxysuccinimide, par exemple le succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) la réaction (Ishikawa et al., 1983, J. Immunassay 4, 209-327) a lieu à pH 7,3 dans le tampon phosphate. La protéine dont les résidus NH₂ sont ainsi activés est séparée par dialyse.

Les dérivés T₃-O-CH₂-CONH-Cys ou T₃-O-CH₂-CONH-Gly-Cys (amidés) sont conjugués par le groupe sulfhydryle aux protéines modifiées, à pH 6,5.

Les produits sont séparés par dialyse, on obtient des dérivés de formule générale T₃-O-CH₂-CO-NH-Cys-S-SMCC-BSA.

3. Préparation du O-carboxyméthyl thyroxine (T₄-O-CH₂-COOH)

On procède à la déprotection du groupement amine par adjonction de 200 µl de TFA (200 mg) au dérivé BOC-T₃-O-CH₂-COOH ou BOC-T₄-O-CH₂-COOH lyophilisés et refroidis à -20°C. Après une minute d'action, le TFA est évaporé sous azote gazeux.

Stade B

4. Iodation des dérivés

On ajoute à 1 nmole de T₃, de BOC-T₃ ou de BOC-T₃-O-CH₂-COOH, 1 mCi de [¹²⁵I]Na (2000 Ci/mmole, NEN) et 10 µl de chloramine T (CT 1mg/ml). Après 90 sec., la réaction est arrêtée par 50 µl de métabisulfite de sodium (MBS) pendant 2 mn. Après adjonction de 20 µl de méthanol et agitation, on dilue dans 1,5 ml de TFA (0,05 %).

La séparation des produits de la réaction se fait selon le protocole décrit en A. 1. pour les dérivés de l'exemple 1. Les produits sont exclus dans le gradient méthanol respectivement à : [¹²⁵I]T₄ 62 % ; BOC [¹²⁵I]T₄, 80 % ; BOC [¹²⁵I]T₄-O-CH₂-COOH, 82 %.

Les dérivés radiomarqués sont dilués dans le méthanol. Le BOC [¹²⁵I]T₄-O-CH₂-COOH est déprotégé comme indiqué en 3.

EXEMPLE 2. Synthèse de dérivés de la sérotonine

Série d'exemples répondant à la formule générale I :



dans laquelle

R' = R'' = H

A = -CH₂-CH₂-

B = noyau indole (OH en 5, aminoéthyl en 3)

1. Synthèse du N-tertiobutyl carbamate, 5-O-carboxyméthyl tryptamine [BOC-S-CM]

Dérivé de formule type (IV) Y-HN-A-B-O-CH₂-COOH

Stade A

1.1. Protection du groupe amine

La protection du groupement amine de la 5-HT est réalisée avec le di-t-butylidicarbonate [(BOC)₂O] (Tarbell et al., 1972). On procède au mélange de volumes égaux d'oxalate de sérotonine 50 mM et de (BOC)₂O 50 mM dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) en présence de triéthylamine (TEA). La réaction est immédiate à température ambiante.

1.2. Carboxyméthylation du groupement hydroxyphényle

La protection par le BOC n'est pas utile pour certains dérivés de la sérotonine qui, comme la bufoténine, possèdent une amine tertiaire, les résidus R' et R'' de la formule générale étant des groupes méthyle. Le reste de la molécule (résidus A et B) étant identiques à la sérotonine, on peut procéder directement à

la O-carboxyméthylation de la bufoténine dans les mêmes conditions que celles décrites ci-après pour le BOC-S.

La solution obtenue en 1.1. ci-dessus (exemple 2) est mélangée volume à volume avec une solution aqueuse d'acide bromoacétique 500 mM, le pH ajusté à 12 en présence d'oxyde de magnésium et d'azote gazeux. Le pH, l'absence d'oxygène et de lumière sont maintenus constants pendant 24 heures. Le milieu est centrifugé 5 mn à 10 000 tours/mn.

1.3. Purification par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La séparation du dérivé carboxyméthyl-O-5-tryptamine-BOC (BOC-S-CM) de la sérotonine BOC (BOC-S) et des produits d'oxydation se fait par CLHP.

Le surageant est dilué dans deux volumes d'une solution aqueuse à 1 % d'acide trifluoroacétique. 1,8 ml de ce mélange est injecté dans un CLHP sur colonne de silice greffée Ultrasphère ODS C₁₈ (5 µm, diamètre 4,6 mm, longueur 15 cm), par élution isocratique (H₂O-TFA 0,05 %, 55 vol, méthanol 45 vol). L'élution est suivie par spectrophotométrie.

La séparation des produits de carboxyméthylation de la bufoténine a lieu sur colonne µ Bondapack C₁₈, en élution isocratique TFA 0,05 % 93 vol, acétonitrile 7 vol.

Les fractions recueillies sont analysées en spectrophotométrie. Les spectres d'absorption en milieu basique et acide sont comparés de façon à déterminer si la substitution a bien eu lieu sur le groupement hydroxyle (Korman Clarke, op. cité).

Les fractions contenant le dérivé BOC-S-CM sont évaporées et lyophilisées.

2. Conjugaison de dérivés O-carboxyméthylés avec le radical R-NH₂.

2.1. Allongement de la chaîne latérale nouvellement créée.

On peut créer une liaison amide avec une chaîne peptidique après activation du groupement acide du BOC-S-CM par l'éthylchloroformate (ECF).

La solution d'activation est composée de 5 ml de diméthylformamide (DMF), 7 µl de TEA et 7 µl d'ECF. Un volume de cette solution tel que l'ECF soit équimolaire avec le BOC-S-CM est versé sur le dérivé BOC-S-CM lyophilisé.

Après 5 minutes d'activation à 4°C, on ajoute un volume égal de solution aqueuse de glycyl-tyrosinamide (ou d'histamine, ou de Tyr-Gly, Gly-Tyr, Gly-Gly, Gly-Cys sous forme d'acides libres ou amidés) à une concentration 50 fois supérieure à celle du BOC-S-CM.

Les produits de la réaction sont séparés par CLHP sur colonne Ultrasphère ODS C₁₈, par élution isocratique (H₂O, pH 6 60 vol, méthanol 40 vol).

Les fractions contenant le dérivé sérotoninepeptide (BOC-S-CM-GTANH₂) sont évaporées et lyophilisées.

2.2. Préparation de dérivés macromoléculaires

2.2.1. Greffe de dérivés BOC-S-CM-R sur protéine

Les dérivés obtenus en 1.3. ou 2.1. ci-dessus ou sous forme acide libre sont activés par l'éthylchloroformate (voir 2.1.) et greffés sur une protéine native (BSA) ou modifiée (Gly-BSA).

On sépare par dialyse les dérivés BOC-S-CM-R des dérivés couplés à la BSA du type BOC-S-CM-R-BSA.

Le groupement amine de ces dérivés peut être déprotégé selon 3 ci-dessus.

2.2.2. Greffe de dérivés S-CM-Gly-Cys sur des protéines.

Les protéines sont modifiées par adjonction d'agents hétérobifonctionnels (voir 2.2.2. de l'exemple 1).

Le dérivés S-CM-Gly-Cys est greffé sur les protéines précédentes par le groupe sulfhydryle.

Les produits sont séparés par dialyse, on obtient des dérivés de type S-CM-Gly-Cys-S-MCC-BSA.

3. Déprotection du groupe amine

On verse 200 µl de TFA (200 mg) sur le dérivé de type BOC-S-CO-NHR (avec R = H, Gly-TyrNH₂, His, Gly-Tyr OH, Tyr-GlyNH₂, Gly-GlyOH, Gly-Cys) lyophilisé et refroidi à -20°C. Après une minute d'action, le TFA est évaporé sous azote gazeux.

Les produits de la réaction sont séparés par CLHP sur colonne Ultrasphère ODS C₁₈, par élution isocratique (TFA 0,05 % dans l'eau 65 vol, méthanol 35 vol).

Les fractions contenant le dérivé présentant le groupement amine libre (S-CM-GTANH₂) sont évaporées et lyophilisées.

Stade B

4. Iodation des dérivés S-CM-R

Lorsque le radical R comporte une histamine ou une tyrosine, il est possible de procéder à une iodation par la chloramine T.

On ajoute à 10 µl de S-CM-R (1nmole en milieu PBS), 1mCi de ¹²⁵I Na (2000 Ci/mme, NEN) et 20 µl de CT (1 mg/ml). Au bout de 90 secondes, la réaction est arrêtée par 50 µl de MBS 50 mM. On dilue dans 1,6 ml de TFA 1 %.

La séparation des produits de la réaction a lieu par CLHP sur colonne µ Bondapack C₁₈ par élution isocratique (TFA 0,05 % dans l'eau 72 vol, méthanol 28 vol).

Les fractions obtenues sont comptées en spectrométrie gamma et diluées dans une solution de Krebs.

I Caractéristiques de la liaison des dérivés thyroxine sur les "binding protéines" de la thyroxine.

Du sérum humain normal (100µl) est additionné

des dérivés du stade B de l'exemple 1 (0,1 µl). On précipite par 500 µl de charbon dextran pendant 5 mn à 4°C. Après centrifugation, 10 mn à 1000 tours/mn, on compte l'activité du culot.

La liaison persistant par rapport à la liaison initiale est de 99,9 % pour la [¹²⁵I]T₄, de 80 % pour le BOC[¹²⁵I]-T₄-O-CH₂-COOH et de 75 % pour le [¹²⁵I]T₄-O-CH₂-COOH.

II Etude de la liaison des dérivés de la sérotonine sur les récepteurs centraux

Le test a été réalisé avec le produit de l'exemple 2, stade B.

La distribution des sites de liaison du récepteur à haute affinité de la sérotonine (5-HT₁) est hétérogène dans le système nerveux central du rat (Pazos et Palacios, Brain Research, 346, 1985, p. 205-230, Ségu et al., Brain Research, 384, 1986, p. 205-217). De plus, le contenu en sous-types de sites 5-HT₁ varie selon la structure anatomique concernée.

Le protocole de préparation des coupes de cerveau est commun à toutes les études qui vont suivre. Les animaux sont décapités après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg poids brut). Les cerveaux, rapidement extraits de la boîte crânienne, sont congelés par immersion dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide. Des coupes de 20 µm, réalisées au cryostat à -20°C, sont montées sur lames gélatinées et conservées à -20°C.

Les coupes sont pré-incubées 1 heure à 4°C dans une solution de Krebs (NaCl 118 mM ; KCl 4,8 mM ; CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 1,2 mM, Tris HCl 30 mM pH 7,4) pour éliminer les ligands endogènes.

1. Déplacement par les dérivés S-CM-R de la liaison à haute affinité de la sérotonine sur coupes de cerveau de rat.

1.1. Protocole d'incubation des coupes

Les incubations ont lieu pendant 60 minutes à 20°C dans une solution de Krebs contenant 10 µM de pargyline, 5,7 10⁻⁴ M d'acide ascorbique, 2 nM de [³H]5-HT (NEN, As = 30 Ci/mmmole) et des concentrations croissantes de dérivés S-CM-R. La liaison non spécifique est déterminée sur des coupes homothétiques dans les mêmes conditions mais en présence de 5-HT 10⁻⁵ M.

Après incubation, les coupes sont rincées trois fois pendant 20 secondes dans l'eau distillée et séchées par un courant d'air chaud. Les coupes sont apposées à un film (Amersham) pendant six semaines, en présence d'étalon ([³H] microscale, Amersham). Les films sont développés 6 minutes avec du D19 Kodak, rincés et fixés avec AL4 (Kodak). L'analyse quantitative des radioautogrammes est menée avec un système d'analyse d'images (Ségu et al, J. Neurosci. Methods, 31, 1990, p. 197-208).

1.2. Résultats

La liaison spécifique de la [³H]5-HT est déplacée

de façon monophasique par la 5-HT avec un IC₅₀ de 2 nM. Le S-O-CH₂-COOH (S-CM) déplace avec un IC₅₀ de 1000 nM, le S-CM-Gly-TyrNH₂ et le S-CM-Tyr-GlyNH₂ déplacent la liaison de façon biphasique avec des IC₅₀ de 20 nM pour le premier site et de 400 nM pour le deuxième.

2. Analyse des sites de liaison des dérivés iodés sur les récepteurs centraux du rat.

2.1. Protocole d'incubation des coupes.

Les incubations ont lieu pendant 60 minutes à 20°C dans une solution de Krebs contenant 10 µM de pargyline, 5,7 10⁻⁴ M d'acide ascorbique, 10 g/l de sérum albumine bovine (fraction V, sigma), et 0,03 nM du dérivé S-CM-[¹²⁵I]-R. La liaison non spécifique est déterminée sur des coupes homothétiques dans les mêmes conditions mais en présence de 5 HT 10⁻⁵ M.

Après incubation, les coupes sont rincées deux fois pendant 1 mn dans l'eau distillée et séchées par un courant d'air chaud. Les coupes sont apposées à un film (Amersham) pendant une semaine, en présence d'étalons ([¹²⁵I] microscale, Amersham). Les films sont développés 6 mn avec du D19 Kodak, rincés et fixés avec AL4 (Kodak). L'analyse quantitative des radioautogrammes est menée avec un système d'analyse d'images (Ségu et al., op. cité).

2.2. Distribution du marquage avec les fractions S-CM[¹²⁵I]R

2.2.1. Marquage par le S-CM[¹²⁵I]His

Les fractions de la préparation du dérivé S-CM [¹²⁵I]His (A.4.) ne marquent pas les coupes de cerveau de rat.

2.2.2. Marquage par le S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂

Parmi les fractions recueillies lors de la préparation du dérivé iodé du S-CM-GTNH₂ (A.4.), seule la dernière fraction est retenue de façon spécifique sur les coupes de cerveau de rat. Cette fraction correspond au S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂.

L'observation des radioautogrammes montre au niveau mesencéphalique un marquage intense de la substance noire (SN) et du subiculum dorsal (SD) et aucun marquage de l'hippocampe (H). Cette dernière structure est connue pour contenir presque exclusivement des sites de liaison de type 5-HT_{1A}, alors que les autres contiennent des sites de type 5-HT_{1B} (Hoyer et al, Eur. J. Pharmacol., 118, 1985, p. 1-12). Au niveau antérieur, le striatum (ST) est marqué : il contient surtout des sites 5-HT_{1B}, les plexus choroïdes (Px) contenant des sites 5-HT_{1C} ne le sont pas.

On peut en conclure que le S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ est un marqueur spécifique des sites de liaison à haute affinité de la sérotonine de type 1B.

3. Analyse de sites de liaison du S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ chez le cobaye

Dans le système nerveux central du cobaye, les structures anatomiques contenant des sites de type 5-HT_{1A} et la pharmacologie de ces sites sont les mêmes que chez le rat. Par contre, la pharmacologie des sites contenus dans la substance noire du cobaye

est différente de celle des sites de la même structure chez le rat (Heuring and Peroutka, J. Neurosci., 7, 1987, p. 894-903). Aussi ces sites sont-ils désignés sous le vocable 5-HT_{1D}.

Avec la même méthode de traitement des coupes que celle utilisée en 2 pour le rat, on a démontré que chez le cobaye (figure 6), le S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ marque la substance noire (figure 6C) et pas l'hippocampe (figure 6B).

Le S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ est un marqueur des sites à haute affinité de la sérotonine de type 1D.

Ce dérivé de la 5-HT présente une affinité préférentielle pour les sites 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} par rapport aux sites 5-HT_{1A} et 5-HT_{1C}, ce qui fait de ce ligand un outil important d'analyse des récepteurs à haute affinité de la 5-HT.

Il est aujourd'hui le seul à présenter une sélectivité aussi importante, sans se lier à d'autres types de récepteurs non 5-HT (comme les β -adrénergiques). Par ailleurs, il est le seul à marquer les 5-HT_{1D}. Il peut donc être utilisé pour les études de récepteurs de ce type chez l'homme et leur variation dans les maladies neurodégénératives (chorée de Huntington).

4. Analyse des sites de liaisons chez le singe.

Le test a été réalisé avec le dérivé de l'exemple 2, stade A.

A. Préparation biologique :

Un singe mâle (*Macacca mulatta* n.) de 8 kg a été sacrifié avec une surdose de barbituriques et exsanguination. Une fois la mort de l'animal constatée, la boîte crânienne est enlevée et le cerveau mis à nu. L'hémicerveau droit est découpé et congelé par l'isopentane refroidi dans l'azote liquide. Le bloc est conservé à -20° C. Des coupes de 10 μ m d'épaisseur sont réalisées au cryostat à -20° C, et posées sur des lames gélatinées (Ségu. et al. 1990, J. Neurosci. meth. 31, 197). Elles sont conservées à -20° C jusqu'à utilisation.

- Incubation avec la sonde radioactive :

Les coupes sont préincubées 1h à 4° C dans une solution de Krebs (mM : NaCl, 118 ; KCl 4,5 ; CaCl₂, 1,2 ; MgCl₂, 1,2 ; Tris, 15 ; pH 7,4) afin d'éliminer les ligands endogènes. Elles sont ensuite incubées à 20° C pendant 60 minutes dans une solution contenant de la pargyline 10⁻⁵M, de l'acide ascorbique 57 mM, 10 g/l de sérum albumine bovine et du S-CM-G[¹²⁵I] TNH₂ 0,02 nM seul ou en présence de concentrations croissantes de sérotonine. Certaines coupes sont incubées dans des conditions identiques, mais la sonde radioactive est remplacée soit par [³H]5-HT 2 nM, soit par [³H]5-HT 2 nM en présence de 100 nM de 8-hydroxy-2-[di-N-propylamino] tétraline (8-OH-DPAT) et 100 nM de mésulergine, soit par [³H]8-OH-DPAT 1 nM. Après rinçage 2 x 1 minute dans l'eau distillée, elles sont séchées.

- Radioautographie :

Les lames sont apposées sur un film sensible au

tritium pendant 8 jours. Le film est développé 6 minutes dans le D19, rincé et fixé. Les autoradiogrammes sont quantifiés avec un système vidéo d'analyse d'images (Ségu. et al, 1990).

B. Résultats

L'incubation en présence de [³H]5-HT 2 nM (Fig. 7A) montre un marquage important de l'hippocampe et de la substance noire. Dans ces conditions, tous les types de sites 5-HT_{1A} sont marqués.

L'incubation en présence de [³H]8-OH-DPAT 1 nM (Fig. 7B) qui ne marque que les sites 5-HT_{1A}, montre un marquage intense de l'hippocampe et pas de la substance noire.

Dans le cas de l'incubation dans [³H]5-HT en présence de 100 nM 8-OH-DPAT et mésulergine (Fig. 7C), seuls les sites 5-HT_{1D} sont marqués. Les autoradiogrammes montrent une forte réaction sur la substance noire.

L'incubation dans le S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ 0,02 nM seul (Fig. 7D) montre un marquage quasi-exclusif de la substance noire, comme dans le cas précédent. Ce dérivé O-carboxyméthylé de la sérotonine se lie aux sites 5-HT_{1D}.

Si on déplace la liaison du S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ 0,02 nM par la sérotonine, on obtient une IC₅₀ (concentration inhibant 50 % de la liaison) de l'ordre de 5 nM, montrant donc que la liaison du dérivé est spécifique des sites 5-HT_{1D}.

Conclusion :

Le S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ est un marqueur des récepteurs 5-HT_{1D}. Toute molécule analogue aura donc cette propriété de se lier aux sites 5-HT_{1D}.

5. Analyse des sites de liaisons de S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ chez l'homme

a) Les cerveaux humains post-mortem sont conservés à -20° C. Des coupes de 10 μ m sont réalisées sur des blocs contenant soit le locus niger, soit la corne de Amon. Les coupes sont traitées comme indiqué en 4 pour les coupes de cerveau de singe.

b) Après radioautographie, on observe un fort marquage du locus niger (structure correspondant à la substance noire chez le rat) et un marquage faible sur la corne de Amon (équivalent chez l'homme de l'hippocampe du rat).

Le locus niger contient quasi exclusivement des sites de liaisons de type 5-HT_{1D}, alors que la corne de Amon est composée en majorité de sites de type 5-HT_{1A}.

Le dérivé iodé testé marque donc in vitro les récepteurs 5-HT_{1D} du cerveau humain. Il peut donc être utilisé pour les études de récepteurs de ce type chez l'homme et leur variation dans les maladies neurodégénératives (chorée de Huntington). Les dérivés décrits dans le présent brevet qui présentent cette propriété et qui passent la barrière hémato-encépha-

lique, pourront être utilisés à des fins thérapeutiques dans le cas de dysfonctionnements liés au type de récepteurs concernés (5-HT_{1D}).

III Liaison des dérivés de la sérotonine sur les récepteurs périphériques

1. Franchissement de la barrière hémato-encéphalique.

Lorsque les molécules passent la barrière hémato-encéphalique, elles sont susceptibles d'agir sur les récepteurs du système nerveux central, effet recherché dans de nombreux cas (cf. point 4).

Dans le cas où les récepteurs existent aussi bien en périphérie que dans le système nerveux central, il peut être souhaitable d'avoir des dérivés qui ne passent pas la barrière hémato-encéphalique. Ces dérivés auront alors un effet sur les récepteurs périphériques, sans action centrale prédominante.

A. Protocole expérimental

2 souris et 2 cobayes sont anesthésiés profondément à l'hydrate de chloral (injection intrapéritonéale de 0,12 ml pour 100 g de poids d'une solution à 35 %). La cage thoracique est ouverte, le cœur est mis à nu.

Une injection intracardiaque de S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ de 200 µl pour la souris et 1,5 ml pour le cobaye est réalisée.

Après 10 minutes, les animaux, toujours sous anesthésie profonde sont décapités, les cerveaux congelés et conservés comme indiqué dans l'exemple 1.

On procède à des coupes et à une autoradiographie comme décrit dans l'exemple 1.

B. Résultats

L'examen de coupes passant en divers niveaux du cerveau ne montre aucun marquage, en particulier dans la substance noire, structure anatomique qui est bien marquée lorsque l'on procède à une incubation in vitro dans le même traceur.

Conclusion :

Le dérivé de la sérotonine testé, ne passe pas la barrière hémato-encéphalique, permettant de soulager les effets les plus douloureux de la migraine. Aucune toxicité n'a été observée à la dose injectée.

2. Etude par imagerie in vivo avec une gamma caméra de la répartition de la liaison du dérivé S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂

Etant donné que ce dérivé ne passe pas la barrière hématoencéphalique comme nous l'avons montré en 1, nous avons étudié la distribution du marquage périphérique par imagerie in vivo.

Les animaux (souris) sont anesthésiés et injectés par voie intraveineuse avec du dérivé S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂. Très rapidement, on observe la diffusion du produit dans le cœur, tout le système vasculaire et le foie. 10 minutes après l'injection, le marquage

diminue dans le système vasculaire, sauf le cœur et le tronc vasculaire cérébral. Dans cette dernière zone, le marquage est retenu pendant 15 à 20 minutes, avant de disparaître lentement. Le marquage de la vessie s'accroît à des temps plus longs, le cœur restant marqué assez longtemps.

Une expérience a été réalisée avec un dérivé iodé, présentant la même liaison spécifique que le dérivé ci-dessus, mais ne possédant pas la propriété de se lier spécifiquement sur les sites 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} centraux. Dans ce cas, le déroulement du marquage observé avec la gamma caméra est identique à celui observé avec le S-CM-G[¹²⁵I]-TNH₂, sauf pour le tronc vasculaire cérébral, qui ne présente pas de rétention particulière.

Le S-CM-GTNH₂ et ses dérivés, peuvent donc être utilisés à des fins thérapeutiques dans le soulagement des crises de migraine. Ne pouvant franchir la barrière hématoencéphalique, ils ne sont pas susceptibles de provoquer des effets secondaires par action sur les sites sérotoninergiques centraux de l'homme.

EXEMPLE 3

On a préparé des comprimés répondant à la formule :

5-O-carboxyméthylglycyltyrosinamide (S-CM-GTNH₂)

0,5 mg

excipient q.s. pour un comprimé terminé à

100 mg

(détail de l'excipient : lactose, amidon, talc, stéarate de magnésium)

EXEMPLE 4

On a préparé des comprimés sécables répondant à la formule :

5-O-carboxyméthylglycyltyrosinamide (S-CM-GTNH₂)

2 mg

excipient q.s. pour un comprimé terminé à

100 mg

(détail de l'excipient : lactose, amidon, talc, stéarate de magnésium)

EXEMPLE 5

On a préparé une préparation injectable répondant à la formule :

5-O-carboxyméthylglycyltyrosinamide (S-CM-GTNH₂)

0,5 mg

excipient : eau pour préparation injectable

2 ml

EXEMPLE 6

On a préparé un aérosol nasal répondant à la formule :

5-O-carboxyméthylglycyltyrosinamide (S-CM-GT ₂ NH ₂)	5
30 mg	
excipient : soluté aqueux : chlorure de sodium, citrate trisodique, acide citrique,	
eau distillée	10
15 ml	

EXEMPLE 7

On a préparé un aérosol buccal répondant à la formule :

5-O-carboxyméthylglycyltyrosinamide (S-CM-GT ₂ NH ₂)	15
60 mg	
excipient : soluté aqueux : acide citrique, alcool éthylique, édulcorant, aromatisant, polysorbate 80, propylène glycol,	
eau purifiée	20
50 ml	
Propulseur : azote	25

EXEMPLE 8 : Kit d'analyse d'un récepteur 5-HT_{1D}

On a préparé un kit d'étude de présence du récepteur 5-HT_{1D}, d'affinité de dérivé pour ledit récepteur et de révélation des altérations de l'affinité et du nombre de ces récepteurs, ayant la composition suivante :

- Produit de l'exemple 2, stade B (2000 Ci/mmole) dans du tampon Tris HCL 50 mM pH 7,4	35
15 ml	
- Standard sérotonine (oxalate) lyophilisée, 10 nmoles, et tampon pH 6,2	
- Standard produit de l'exemple 2, stade B, 1 nmoles de sérotonine par flacon, et tampon pH 6,2	40
- Solution d'inhibiteur : pargyline 1,25 mmole, 8-OH-DPAT 12,5 nmoles, mésulergine 12,5 nmoles par flacon, tampon pH 7,4	
- Diluant : tampon salin pH 7,4	
- Filtres : fibre de verre	45

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Purification des produits de la carboxyméthylation de la N-BOC-T₃

A : chromatogramme après CLHP μ Bondapack C₁₈ 0-30 mn : TFA 0,05 % 50 vol, méthanol 50 vol 30-80 mn : gradient méthanol 100 %.

La hauteur des pics n'est pas absolue car il s'agit de deux profils d'élution différents superposés.

B : spectre d'absorption du BOC-T₃ en milieu acide (Ac) et alcalin (Al). Ordonnées : D.O.

Abscisses : longueur d'ondes de 220 à 350 nm.

Le spectre est déplaçable en milieu basique, comme pour la T₃.

C : spectre d'absorption du BOC-T₃-OCH₂-CO-OH en milieu acide (Ac) et alcalin (Al).

Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes de 220 à 350 nm. Le spectre n'est pas déplaçable en milieu basique.

Figure 2 : Purification des produits de la carboxyméthylation de la sérotonine-N-BOC (BOC-S)

A : chromatogramme après CLHP sur Ultrasphère ODS C₁₈ en isocratique H₂O-TFA 0,05 % 55 vol, méthanol 45 vol.

En ordonnées : densité optique (D.O.) pour diverses longueurs d'ondes (indiquées à droite). En abscisses, le temps en minutes.

B : spectre d'absorption ajusté à 280 nm du produit sortant à 28 minutes, le BOC-S (trait plein) et de celui sortant à 36 minutes, le BOC-S-CM (trait pointillé). Ordonnées : D. O., abscisses : longueurs d'ondes 200 à 350 nm.

C : spectre d'absorption du BOC-S-CM en milieu acide (Ac) et alcalin (Al). Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes 200 à 350 nm.

D : spectre d'absorption de la sérotonine en milieu acide (Ac) et alcalin (Al). Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes 200 à 350 nm.

E : spectre d'absorption du BOC-S- en milieu acide (Ac) et alcalin (Al). Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes 200 à 350 nm.

Remarquer que le spectre est déplacé en milieu basique comme pour la sérotonine (figure 1D). Ce n'est pas le cas du BOC-S-CM (figure 1C) qui est substitué sur le OH.

Figure 3 : Purification des produits de la conjugaison du BOC-S-CM et du GTNH₂

A : chromatogramme après CLHP sur Ultrasphère C₁₈ en isocratique H₂O pH 6 60 vol, méthanol 40 vol.

Ordonnées : D.O. pour diverses longueurs d'ondes (indiquées à droite). En abscisses, le temps en minutes.

B : spectre d'absorption ajusté à 280 nm du produit sortant à 18 minutes, le GTNH₂ (trait plein) de celui sortant à 35 minutes, le BOC-S-CM (trait pointillé court) et de celui sortant à 48 minutes, le BOC-S-CM-GTNH₂ (trait pointillé long). Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes de 200 à 350 nm.

C : spectre d'absorption du BOC-S en milieu acide (Ac) et alcalin (Al). Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes de 200 à 350 nm.

D : spectre d'absorption du GTNH₂ en milieu acide (Ac) et alcalin (Al). Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes de 200 à 350 nm.

E : spectre d'absorption du BOC-S-CM-GTNH₂ en milieu acide (Ac) et alcalin (Al). Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes de 200 à 350 nm. Remarquer que le déplacement du spectre

en milieu alcalin ne correspond pas du tout à celui d'une sérotonine non substituée sur le OH (figure 2C), tout en étant plus déplacé que le spectre du BOC-S-CM (figure 1C). On observe un déplacement vers les grandes longueurs d'ondes, comme pour le GTNH₂ (figure 2D), mais cette modification est moins élevée en D.O.

Figure 4 : Purification des produits de déprotection de l'amine du BOC-S-CM-GTNH₂

A : chromatogramme après CLHP sur C₁₈ Bondapak en isocratique H₂O-TFA 0,05 % 65 vol. méthanol 35 vol.

Ordonnées : D.O. pour 280 et 300 nm - Abscisses, temps en minutes.

B : spectre d'absorption ajusté à 280 nm du produit sortant à 24 minutes, le S-CM (trait plein) et celui sortant à 30 minutes, le S-CM-GTNH₂ (trait pointillé). Le spectre du produit sortant à 60 minutes, le BOC-S-CM-GTNH₂ est identique à celui montré sur la figure 2B.

C : spectre d'absorption du S-CM-GTNH₂ en milieu acide (Ac) et alcalin (Al). Ordonnées : D.O. - Abscisses : longueur d'ondes de 200 à 350 nm. Remarquer que le déplacement du spectre en fonction du pH est identique à celui obtenu pour le BOC-S-CM-GTNH₂ montré sur la figure 2E.

Figure 5 : Analyse des sites de liaison du S-CM-G[¹²⁵I]-TNH₂ chez le rat - Coupes (10 µm) de cerveau de rat incubées dans S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ 0,03 nM.

A : au niveau antérieur

Px : plexus choroïdes ; St : striatum

B : au niveau mésencéphalique

SD : subiculum dorsal ; SN : substance noire ;

H : hippocampe

C : liaison non spécifique au niveau mésencéphalique établie en présence de 5-HT 10⁻⁵ M Remarquer que Px et H ne sont pas marqués (alors qu'ils contiennent respectivement des sites 5-HT_{1C} et 5-HT_{1A}) et que St, SD et SN (qui possèdent des sites 5-HT_{1B}) sont marqués.

Figure 6 : Analyse des sites de liaison du S-CM-G[¹²⁵I]-TNH₂ chez le cobaye - Coupes (10 µm) de cerveau de cobaye incubées dans S-CM-G[¹²⁵I]TNH₂ 0,03 nM.

A : au niveau antérieur

Px : plexus choroïdes ; St : striatum

B : au niveau hippocampe

SD : subiculum dorsal ; H : hippocampe

C : Niveau substance noire :

SN : substance noire

Remarquer que Px et H ne sont pas marqués (alors qu'ils contiennent respectivement des sites 5-HT_{1C} et 5-HT_{1A}) et que St, SD et SN (qui possèdent des sites 5-HT_{1B}) sont marqués.

Figure 7 : Détection des récepteurs 5-HT₁ sur coupes de cerveau de singe (Macacca mulatta n). Les coupes (10 µm) de tissu congelé sont incubés avec diverses sondes et radioautographiées.

A. Incubation dans [3H]5-HT 2 nM montrant les sites 5-HT₁ totaux dans l'hippocampe (H), la substance noire (SN).

B. Incubation dans [3H]8-OH-DPAT 1 nM montrant les sites 5-HT_{1A} exclusivement localisés dans l'hippocampe.

C. Incubation dans [3H]5-HT 2 nM de 100 nM 8-OH-DPAT et 100 nM mésulergine, montrant les sites 5-HT_{1B} quasi exclusivement localisés dans la substance noire.

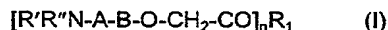
D. Incubation [125I]S-CM-GTNH₂ 0,02 nM, montrant un marquage exclusif de la substance noire, similaire à celui montré en C.

E. Même incubation que D mais additionné de 10⁻⁵ M 5HT montrant la liaison non spécifique (échelle = 1 cm).

F. Schéma des structures anatomiques, tiré au niveau A11,5 de l'atlas Riche et al. 1968.

Revendications

1. Les dérivés de molécules biologiquement actives comportant une fonction amine primaire et un noyau hydroxylé ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale I :



dans laquelle

n représente un nombre entier de 1 à 10 ;

A représente une chaîne alcoylène linéaire ou ramifiée renfermant de 1 à 5 atomes de carbone ;

B représente un noyau aromatique comportant de 6 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitués et éventuellement un hétéroatome, ou un groupement -B₁-X-B₂, dans lequel B₁ et B₂ ont la signification de B ci-dessus et X représente un atome d'oxygène ou une chaîne alcoylène renfermant de 1 à 4 atomes de carbone,

- R₁ représente un reste aminé ou un reste d'un alcool, et

R' et R'' représentent un radical alcoyle renfermant de 1 à 5 atomes de carbone, un atome d'hydrogène ou un radical hydrophobe, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques, étant entendu que R' et R'' ne peuvent pas représenter un radical dérivé du 2-hydroxy-3-phénoxypropyle ou du 2-hydroxy-2-phényléthyle.

2. Les dérivés de formule (I) tels que définis à la revendication 1, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques, caractérisés en ce que B représente un noyau phényle, indole ou un groupement p-phénoxyphényle,

- éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, notamment un groupement 4-(3,5-diiodophénoxy)-3,5-diiodophényle.
3. Les dérivés selon la revendication 2, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques, caractérisés en ce que R_1 représente un radical NHR dans lequel R représente un reste d'une diamine, d'une protéine, d'un acide aminé ou d'un polypeptide constitué au plus de 5 acides aminés ou des dérivés desdits acides aminés ou polypeptides, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques. 5
 4. Les dérivés selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisés en ce que R' et R'' représentent un radical alkyle linéaire ou ramifié renfermant de 1 à 5 atomes de carbone, et A représente un radical $-CH_2-CH_2-$, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques. 10
 5. Le tryptamine-5-O-carboxyméthylglycyltyrosinamide [S-CM-GT NH_2], ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques. 15
 6. Procédé de préparation des dérivés de formule (I) tels que définis à la revendication 1, ainsi que de leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques, caractérisé en ce que l'on fait réagir un dérivé de formule (II) : 20

$$R'R''-N-A-B-OH \quad (II)$$
 dans laquelle R' , R'' , A et B ont la signification déjà indiquée, avec un dérivé comportant un groupement protecteur des fonctions amine dans le cas où $R' = R'' = H$, pour obtenir un dérivé de formule (III) : 25

$$Y-HN-A-B-OH \quad (III)$$
 dans laquelle A et B ont la signification déjà indiquée et Y représente un groupement protecteur des fonctions amine, facilement clivable, que l'on fait réagir avec un acide halogéno-acétique pour obtenir un dérivé de formule (IV) : 30

$$Y-HN-A-B-O-CH_2COOH \quad (IV)$$
 dans laquelle A, B et Y ont la signification déjà indiquée, que l'on fait réagir avec un dérivé aminé ou un dérivé d'un alcool pour obtenir le dérivé de formule (I) telle que définie ci-dessus, le cas échéant sous forme dimère de formule (I') : 35

$$R'R''-N-A-B-O-CH_2CO-NH-R-NH-CO-CH_2O-B-A-N-R'R'' \quad (I')$$
 dans le cas d'une diamine ou polymère dans le cas d'une polyamine, que l'on isole et, si désiré, salifie. 40
 7. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif l'un au moins des médicaments tels que définis à la revendication 1. 45
 8. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif l'un au moins des médicaments tels que définis à l'une quelconque des revendications 2, 3 ou 4. 50
 9. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif l'un au moins des médicaments tels que définis à la revendication 5. 55
 10. Les dérivés selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce qu'ils se présentent sous une forme marquée, le marqueur pouvant être un élément radioactif, en particulier ^{125}I , une molécule fluorescente, une enzyme, une protéine portant un or colloïdal ou un produit de contraste.
 11. Application des dérivés selon l'une quelconque des revendications 4 et 6 à l'imagerie des sites de liaison des médiateurs endogènes.
 12. Application des dérivés selon l'une quelconque des revendications 5 et 10 à la purification des récepteurs des médiateurs endogènes.
 13. Les dérivés selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce qu'ils comportent une protéine greffée sur le chaînon O-carboxyméthyle selon les procédés de la revendication 5.
 14. Application des dérivés selon la revendication 13, à la préparation d'anticorps dirigés contre les médiateurs endogènes et leurs dérivés.
 15. Application des dérivés selon les revendications 1 à 5 et en particulier les dérivés de la thyroxine O-carboxyméthyle à l'inhibition de la liaison aux protéines de transport, pour le dosage de l'hormone totale.
 16. Kits d'analyse pour le dosage des médiateurs et de leurs dérivés, caractérisés en ce qu'ils renferment l'un au moins des dérivés selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, 10, 13 et 15.

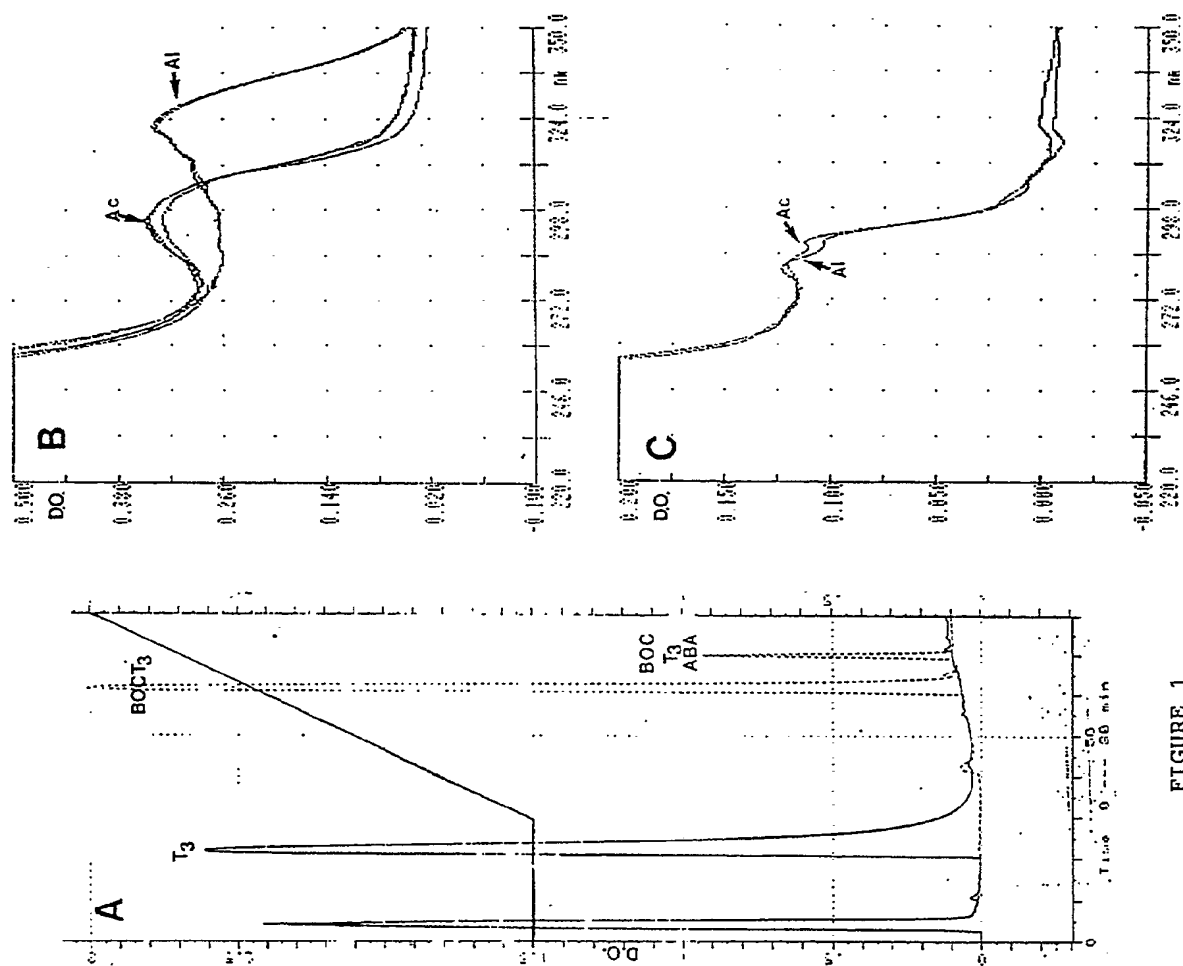


FIGURE 1

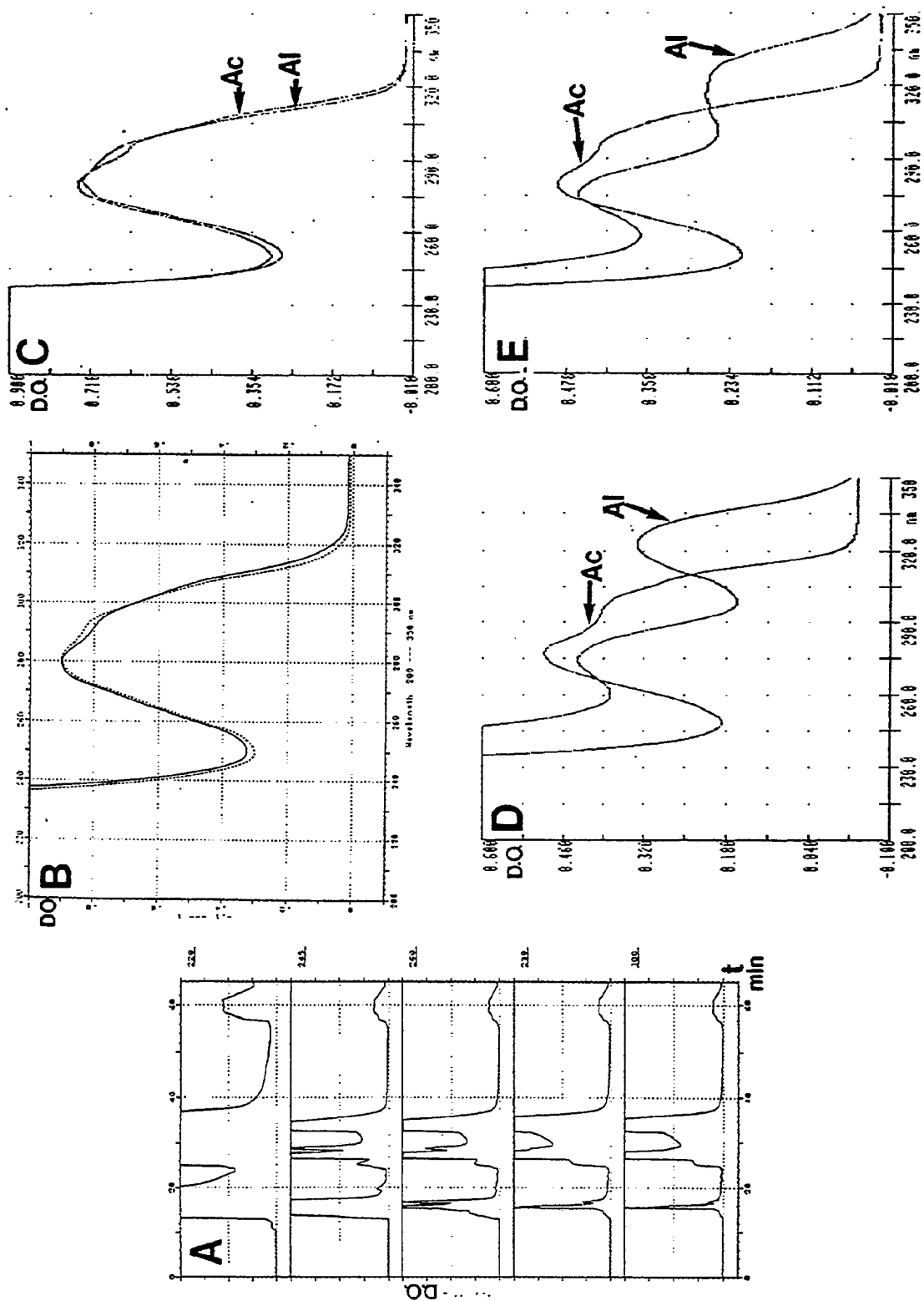


FIGURE 2

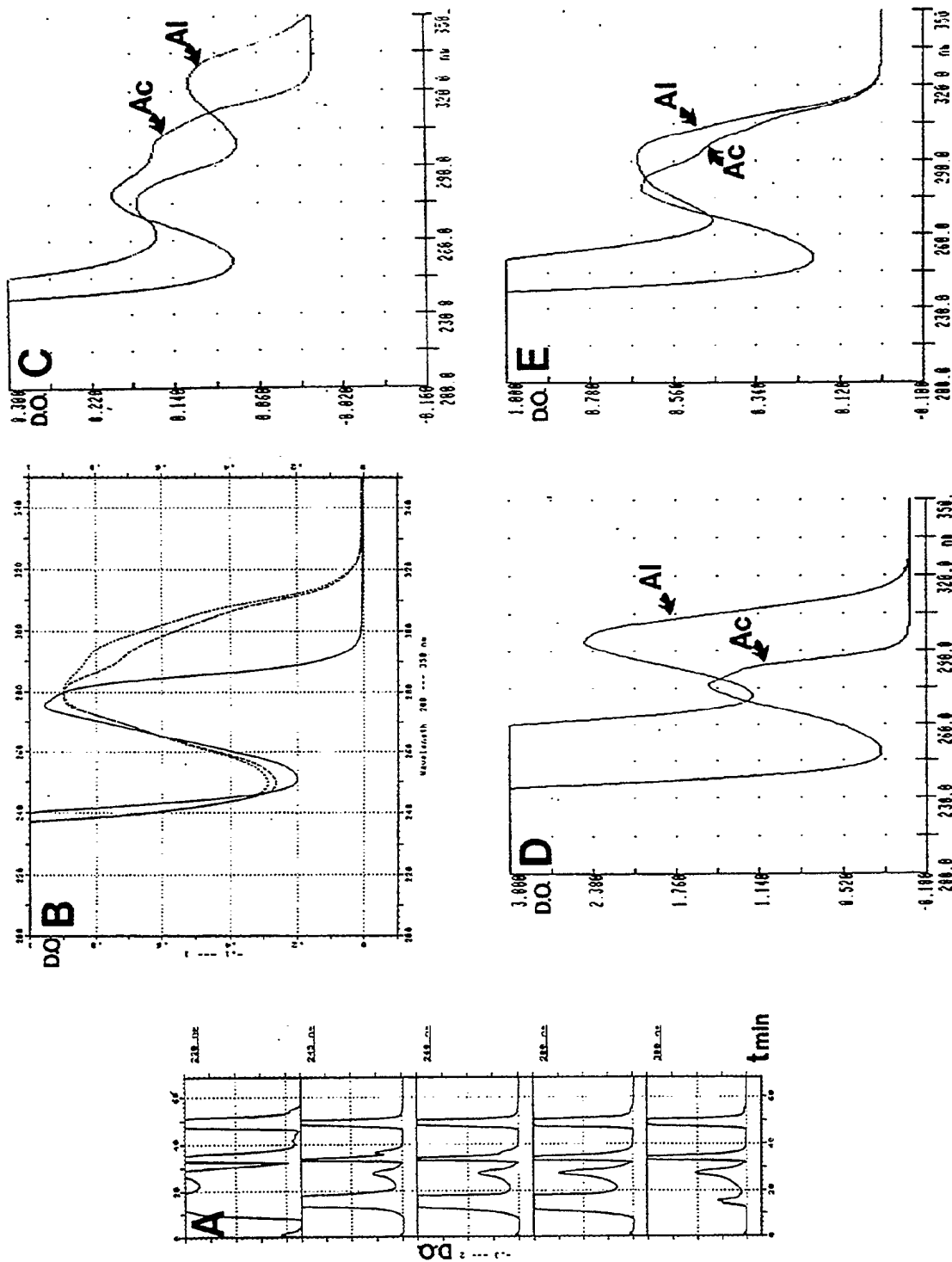


FIGURE 3

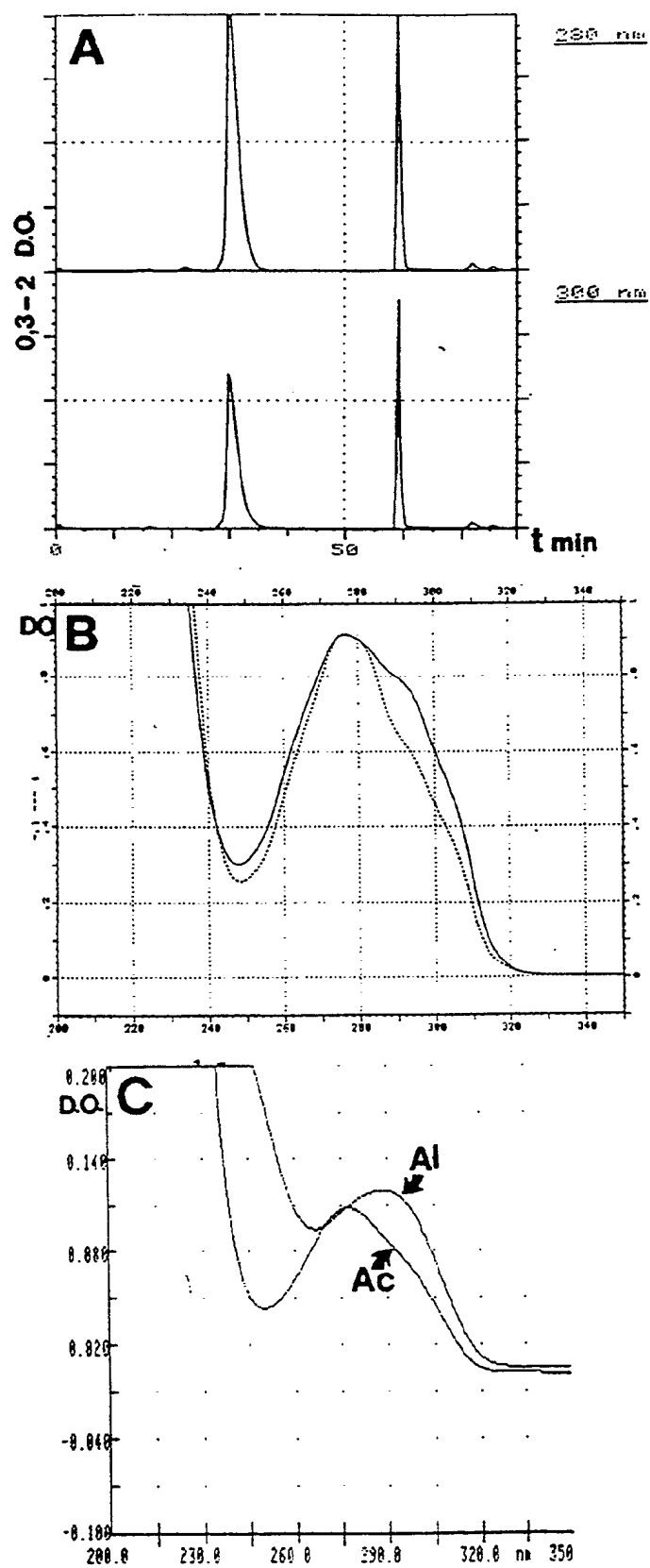


FIGURE 4

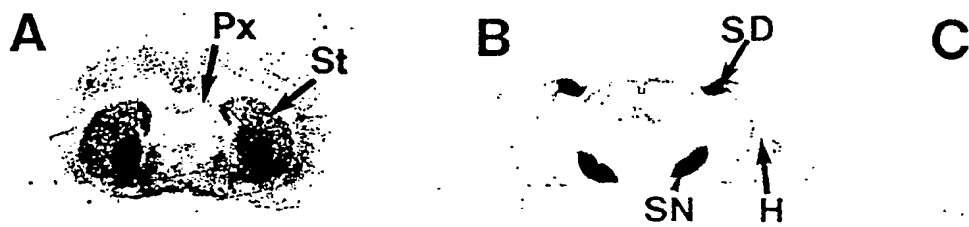


FIGURE 5

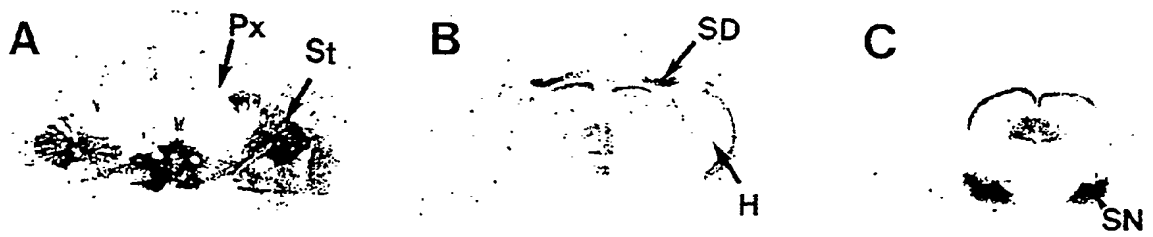


FIGURE 6

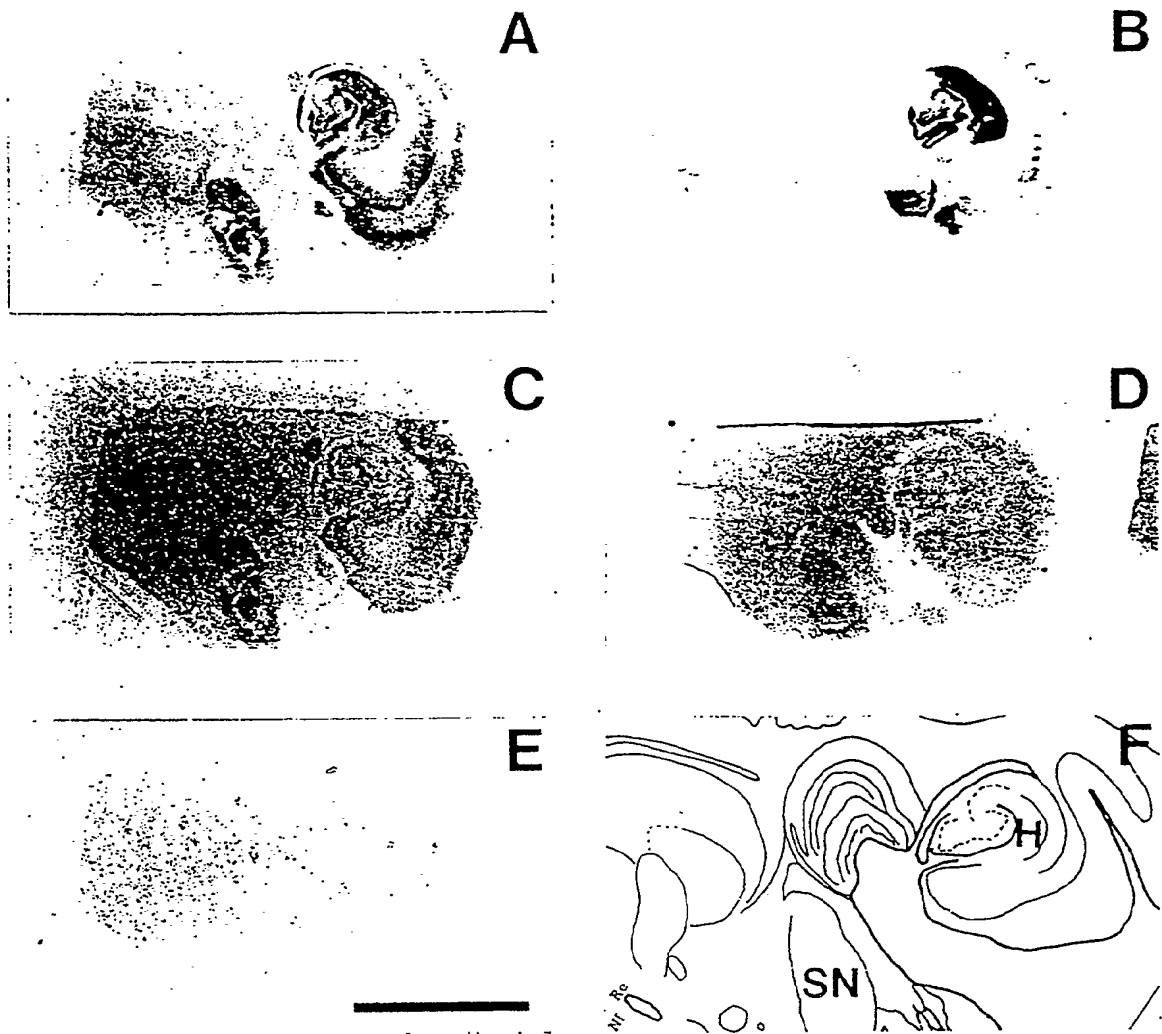


FIGURE 7



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 91 43 0009

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
X	DE-A-2 737 802 (HENNING BERLIN GmbH PHARMAWERK) * Totalité * ---	1-2,7-8 ,10,16	C 07 C 229/36 C 07 D 209/16 G 01 N 33/78
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 261, no. 25, 5 septembre 1986, pages 11613-11622, Baltimore, US; J. KOEHRLE et al.: "Rat liver iodothyronine monodeiodinase" * Page 11616, no. 22 * ---	1-2,7-8	
A	EP-A-0 006 792 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) * Page 3, ligne 6 - page 5, ligne 5 * ---	1-16	
A	US-A-4 040 907 (ULLMAN et al.) * Colonne 1, ligne 50 - colonne 2, ligne 66 * ---	1-16	
X,P	EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 194, 1991, pages 91-98; P. BOULENGUEZ et al.: "A new 5-hydroxy-indole derivative with preferential affinity for 5-HT1B binding sites" * En tout * -----	1-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) C 07 C C 07 D G 01 N
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 09-08-1991	Examineur KORSNER S.E.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 150 03.82 (P0402)